



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM BIOLOGICKÝCH ÚČINKŮ VYBRANÝCH
ROSTLINNÝCH MATERIÁLŮ**

STUDY OF BIOLOGICAL EFFECTS OF SOME PLANT MATERIALS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nela Drabíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1378/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Nela Drabíková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název bakalářské práce:

Studium biologických účinků vybraných rostlinných materiálů

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je studium aktivních složek a biologických účinků vybraných druhů rostlinných materiálů s vyšším obsahem oleje.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na přehled rostlin s vyšším obsahem oleje a jejich účinků na organismus
- 2) výběr studovaných rostlinných materiálů a charakterizace jejich složek
- 3) stanovení antioxidačních účinků lipidických extraktů a jejich složení
- 4) testování biologických účinků extraktů na lidských buněčných kulturách
- 5) vyhodnocení a interpretace výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Nela Drabíková
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá přípravou vodných, ethanolových a hexanových extraktů získaných z rostlinných zdrojů se zvýšeným obsahem oleje, jejich charakterizací a testováním cytotoxicity. V teoretické části byla vypracována rešerše zaměřená na základní informace o použitých rostlinách a jejich účincích na lidský organismus. Dále byly popsány aktivní složky extraktů a metody jejich stanovení a princip použitého testu cytotoxicity.

V praktické části byl u rostlinných extraktů spektrofotometricky stanoven obsah polyfenolů a flavonoidů a byla změřena jejich celková antioxidační aktivita. Pomocí plynové chromatografie byl stanoven obsah mastných kyselin a procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Dále byl proveden MTT test cytotoxicity na buněčné kultuře, aby bylo potvrzeno jejich další možné využití v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

ABSTRACT

The presented bachelor thesis deals with the preparation of aqueous, ethanolic and hexane extracts obtained from plant sources with increased content of oil, their characterization and cytotoxicity testing. In the theoretical part, a review focused on basic information about the used plants and their effects on the human body was elaborated. Furthermore, the active ingredients of the extracts, methods of their determination and the principle of the cytotoxicity test were described.

In practical part the content of polyphenols and flavonoids was determined spectrophotometrically. Further, total antioxidant activity was measured. The fatty acids composition and the percentage of individual fatty acids were determined by gas chromatography. Next, MTT cytotoxicity assay was performed using human cell culture to confirm the safety of extracts for potential use in food, cosmetic and pharmaceutical industries.

KLÍČOVÁ SLOVA

Olejové extrakty, rostlinné extrakty, antioxidanty, cytotoxické testy, mastné kyseliny, MTT

KEYWORDS

Oil extracts, plant extracts, antioxidants, cytotoxic assays, fatty acids, MTT

DRABÍKOVÁ, Nela. *Studium biologických účinků vybraných rostlinných materiálů*. Brno, 2019, 42 s. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115841>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu, za její vstřícný přístup a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Renatě Pavelkové za cenné rady, velkou ochotu, podporu, odborný dohled a trpělivost při zpracovávání mé experimentální části. V neposlední řadě patří poděkování také Království chemiček za konzultace všeho druhu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Volné radikály	8
2.2	Vybrané přírodní vzorky	8
2.2.1	Kokosový ořech	8
2.2.2	Dýňová semínka	9
2.2.3	Vlašský ořech	10
2.2.4	Maková semínka	11
2.2.5	Mandle	11
2.2.6	Sezamová semínka	12
2.2.7	Fíky	13
2.2.8	Káva	13
2.3	Antioxidační látky	14
2.3.1	Polyfenoly	15
2.3.2	Flavonoidy	15
2.3.3	Celková antioxidační aktivita	16
2.3.3.1	Metoda TEAC	16
2.4	Mastné kyseliny	16
2.4.1	Nasycené mastné kyseliny	16
2.4.2	Mononenasycené mastné kyseliny	17
2.4.3	Polynenasycené mastné kyseliny	17
2.5	Cytotoxické testy	17
2.5.1	MTT test	17
3	CÍL PRÁCE	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1	Použité chemikálie	20
4.1.1	Chemikálie použité na přípravu extraktů	20
4.1.2	Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovení	20
4.1.3	Chemikálie použité na stanovení antioxidační aktivity	20
4.1.4	Chemikálie použité pro práci s buňkami	20
4.1.5	Chemikálie použité na stanovení mastných kyselin	20
4.2	Použité přístroje a pomůcky	20
4.3	Optimalizace přípravy přírodních extraktů	21
4.3.1	Příprava vodných extraktů	21
4.3.2	Příprava ethanolových extraktů	21
4.3.3	Příprava hexanových extraktů	21

4.3.4	Příprava olejových extraktů	21
4.4	Charakterizace extraktů	21
4.4.1	Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů	22
4.4.2	Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů	22
4.4.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS	22
4.4.4	Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie	22
4.5	Kultivace humánních keratinocytů linie HaCaT	23
4.6	MTT test cytotoxicity	23
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
5.1	Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů	25
5.1.1	Obsah polyfenolů v extraktech	25
5.2	Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů	27
5.2.1	Obsah flavonoidů v extraktech	27
5.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity	29
5.3.1	Celková antioxidační aktivita	29
5.4	Stanovení mastných kyselin	31
5.4.1	Maková semínka	31
5.4.2	Dýňová semínka	32
5.4.3	Vlašské ořechy	32
5.4.4	Kokos	32
5.4.5	Mandle	32
5.4.6	Sezam	33
5.4.7	Fíková semínka	33
5.4.8	Káva	33
5.5	MTT test cytotoxicity	35
6	ZÁVĚR	37
7	SEZNAM POUŽITÝCH	38
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	42

1 ÚVOD

Lidské tělo je denně vystavováno volným radikálům vznikajícím v organismu jako vedlejší produkty látkové výměny v buňkách. Těchto radikálů se často tvoří větší množství, než je tělo samo schopno eliminovat a stávají se díky své reaktivitě nebezpečnými pro buněčné membrány či genetickou informaci buněk. Urychlují stárnutí buněk a narušují přirozenou obranyschopnost organismu, a proto je nutné, aby bylo zabráněno jejich nadměrnému hromadění. K tomuto procesu slouží antioxidanty, což jsou látky obsažené v potravinách a farmaceutických či kosmetických výrobcích.

Jako antioxidanty označujeme látky, které dokáží vychytávat volné radikály působící jak zevnitř organismu, tak i z vnějšího prostředí. Při dlouhodobém vystavení těmto radikálům je organismus náchylný k rozvoji neurodegenerativních, kardiovaskulárních nebo i onkologických onemocnění. K ochraně proti těmto radikálům je třeba přijímat antioxidanty potravou či topicky v podobě kosmetických přípravků. V současnosti jsou přírodní antioxidanty a jejich účinky předmětem mnoha studií a nalezneme mnoho dostupných aktuálních článků, které se zabývají působením přírodních antioxidantů.

Volné radikály se často tvoří například i vlivem alkoholu, kouření, zplodin z ovzduší nebo také nedostatkem spánku a zvýšeným stresem působícím na organismus. Právě kvůli těmto škodlivým vlivům okolí je velmi důležité dbát na dostatečný příjem vitamínů, minerálů a jiných látek antioxidačního charakteru působících proti těmto vlivům. V dnešní době se již na trhu vyskytují velká množství relativně dostupných syntetických farmaceutických i kosmetických výrobků, které obsahují vyhledávané antioxidační látky a slibují jejich pozitivní účinky na organismus. Ale žijeme v době, kdy se lidé začínají opět obracet k přírodě, a proto dnes již spousta lidí směřuje svou pozornost zpátky k přírodním zdrojům. Využití přírodních zdrojů dnes mimo farmaceutického a potravinářského průmyslu nachází své místo také v kosmetickém a oděvním průmyslu.

Pro tuto práci bylo vybráno osm různých rostlinných zdrojů antioxidantů se zvýšeným obsahem lipidů, které byly charakterizovány na obsah polyfenolů a flavonoidů, a byla proměřena jejich celková antioxidační aktivita. Dále byly připraveny lipidické extrakty v hexanu, ze kterých byly určeny a kvantifikovány mastné kyseliny. Na základě předešlých testů byly vybrány extrakty s nejvyšším obsahem aktivních látek a antioxidační aktivitou a u nich byla dále otestována i jejich cytotoxicita, a tím i jejich bezpečnost a vhodnost pro potenciální aplikace v kosmetice, potravinářství či farmaceutickém průmyslu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Antioxidanty jsou přirozenou součástí lidského organismu, a měly by být přijímány v přiměřeném množství v běžné stravě. Antioxidanty přírodní povahy přítomné v potravinách ničí volné radikály, které mohou v organismu způsobovat oxidační stres a podílet se tak na vzniku závažných onemocnění (kardiovaskulárních, neurodegenerativních, rakoviny, šedého zákalu atd.). Mimo jiné chrání antioxidanty molekuly DNA, lipidů a proteinů před poškozením volnými radikály. Antioxidanty obsažené v rostlinách se zvýšeným obsahem oleje (vitamíny, stopové prvky, fenolické sloučeniny, aminokyseliny) zpomalují aterosklerotické procesy, inhibují akumulaci cholesterolu v krevním séru a zvyšují rezistenci cévních stěn proti lámavosti [1]. Olejová složka slouží jako rozpouštědlo pro některé vitamíny a jako zdroj esenciálních mastných kyselin, které jsou mimo jiné výchozím metabolitem pro syntézu prostaglandinů. Prostaglandiny se rovněž podílejí na zajištění oxidační rovnováhy organismu [1].

Různé druhy ořechů, zejména vlašské ořechy, se řadí mezi potraviny rostlinného původu s nejvyšším podílem antioxidantů. Ořechy mají příznivé účinky na prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Tyto pozitivní účinky mohou být zprostředkovány pomocí mastných kyselin, vlákniny, antioxidačními látkami nebo kombinací všech těchto mechanismů. Nedávná pozorování naznačují, že antioxidanty obsažené v ořeších mají zajímavé biologické účinky související právě s příznivým vlivem na kardiovaskulární onemocnění [1].

2.1 Volné radikály

Jako volné radikály nazýváme vysoce reaktivní částice vznikající jako vedlejší produkty látkové výměny lidského organismu. Dále mohou vznikat díky vnějším faktorům, jako je například znečištěné ovzduší a stresu nebo třeba špatné stravě [2].

Jsou to částice, kterým chybí elektron, a proto vyvolávají oxidační proces, který může být pro lidský organismus škodlivý. Když chybějící elektron získají z jiné látky, stává se z ní taktéž volný radikál a vzniká tak řetězová reakce, během které dochází k poškození buněčných struktur, membrán či proteinů, a především se mění struktura DNA. Volné radikály tedy urychlují stárnutí buněk a oslabují imunitní systém [2].

2.2 Vybrané přírodní vzorky

2.2.1 Kokosový ořech

Jako kokosový ořech je nazýván plod, respektive semeno, palmy z čeledi arekovitých, a to kokosovníku ořechoplodého (*Cocos nucifera*). Tato palma pochází pravděpodobně z jihovýchodní Asie a pěstuje se především v tropických oblastech u velkých řek a na březích moří [3].

Kokosový ořech disponuje velmi tvrdou skořápkou na povrchu a bílou dužinou, která se vyskytuje spolu s kokosovou vodou uvnitř plodu. Tyto plody mají různý tvar, od protáhlého až ke kulovitému a mohou vážit až 3,7 kg. V potravinářském průmyslu se využívá jako pochutina, ale také pro lisování kokosového oleje, který se dále využívá kromě potravinářství například i v kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu. Dužina se využívá například i při léčení nervových onemocnění, ztrátách paměti a onemocněních kůže. Kůra těchto plodů slouží k výrobě kokosového textilního vlákna [3], [4].

Bílá dužina obsažená uvnitř plodu se skládá přibližně z 60 % tuků, 20 % sacharidů, 8 % proteinů a 6 % vody. V kokosovém oleji jsou poté obsaženy nasycené mastné kyseliny jako například kyselina laurová, která urychluje metabolismus, a kyselina myristová, jejíž ester s isopropylalkoholem se hojně využívá v kosmetice [5]. Kokosová voda, která vyplňuje dutinu plodu, je bohatá na draslík, hořčík, vitamín B, vitamín C, a je považována za jeden z nejlepších elektrolytů vyskytujících se volně v přírodě [4].



Obrázek 1: Kokosový ořech [6]

2.2.2 Dýňová semínka

Jako dýňová semínka označujeme semena rostlin z čeledi tykvovitých (Cucurbitaceae), mezi které patří například tykev olejná (*Cucurbita pepo* var. *oleifera*). Tykev olejná patří mezi jednodomé cizosprašné rostliny a vznikla spontánní mutací tykve obecné. Její semena obsahují velké množství oleje a bílkovin, čehož se využívá v potravinářství i kosmetickém průmyslu [7].

Semena mohou mít různou barvu (bílá, žlutá, hnědozelená, černá) i tvar (plochá, eliptická) a obsahují přibližně 45–50 % oleje, 32–38 % dusíkatých látek, 3–5 % sacharidů, 2–4 % hrubé vlákniny a 4–6 % minerálních látek. Oleje ze semen se získávají moderní technologií lisování za studena i za tepla. Olej získaný za studena se dále využívá ve farmaceutickém průmyslu k výrobě léků a olej získaný za tepla se využívá v potravinářství. Olej z dýňových semen obsahuje velké množství aminokyselin, nenasycených mastných kyselin, hořčíku, vápníku, železa a v neposlední řadě zinku. Příznivě působí na krevní oběh i trávicí trakt a vyživuje nehtové lůžko, čímž podporuje růst a zpevnění nehtů [7], [8].

Dýňová semínka jsou bohatým zdrojem nenasycených mastných kyselin, které snižují množství cholesterolu v krvi, a také obsahují velké množství vitamínů (vitamin E, vitamin A, vitamin D) a minerálů (selen, draslík, fosfor, vápník, mangan, železo, měď). Díky svému složení jsou využívány v medicíně pro své antioxidační, antikarcinogenní a protizánětlivé účinky [8].



Obrázek 2: Dýňová semínka [9]

2.2.3 Vlašský ořech

Vlašský ořech je plodem ořešáku královského (*Juglans regia*), což je mohutný listnatý strom spadající do skupiny ořešákovitých. Tento strom patří mezi nejpěstovanější dřeviny na světě a pěstuje se převážně právě kvůli svým plodům (vlašské ořechy) a kvalitnímu dřevu [10].

Tyto plody jsou tvořeny požitelným jádrem, které je obaleno pevnou dřevnatou skořápkou a ochranným obalem, ve kterém dozrávají [10]. Vlašské ořechy se řadí mezi skupinu velmi výživných potravin, jelikož obsahují až 70 % tuků, mezi nimiž nalezneme převážně nenasycené mastné kyseliny (kyselina linolová, kyselina linolenová). Obsažené omega-3-mastné kyseliny působí pozitivně proti riziku kardiovaskulárních onemocnění a podporují rozvoj mozku. Dále jsou ve vlašských ořeších obsaženy vitamíny (vitamin E, B1, B6 a C) a minerály (hořčík, měď, zinek, draslík) společně s flavonoidy (kvercetin, kaempferol) [11].

Díky vysokému procentu živin se uvádí, že konzumace vlašských ořechů výrazně napomáhá při regulaci krevního tlaku a udržování nízké hladiny cholesterolu v krvi. Dalšími kladnými vlastnostmi vlašských ořechů jsou protizánětlivé a antioxidační účinky [12], [13].



Obrázek 3: Vlašské ořechy [14]

2.2.4 Maková semínka

Mák setý (*Papaver somniferum*) patří do čeledi makovitých a je to rostlina, jejíž semena jsou uspořádána v makovici. Makovice je plodem makovitých rostlin a má tvar kulovité tobolky. Tyto nezralé makovice, přesněji bílé mléko z nich, jsou významným zdrojem opia, a proto je pěstování máku v mnoha státech zakázáno [15].

Maková semena obsahují až 45 % tuku, přičemž až 30 % tohoto množství tvoří polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Mimo vysoký obsah tuku jsou maková semena tvořena také 21 % proteinů a 28 % sacharidů. Tato semena obsahují také množství vitamínů (vitamin B1, B3, B6, E a C) a minerálů (vápník, hořčík, železo, draslík, fosfor, zinek) [15], [16].

Z makových semen se lisováním získává makový olej, který je dobře stravitelný a v porovnání s jinými oleji obsahuje jen malé množství fytosterolů (rostlinných sterolů), což jsou sloučeniny strukturálně podobné cholesterolu a jejich vyšší obsah ve stravě redukuje hladinu LDL cholesterolu i celkového cholesterolu v krvi [17].



Obrázek 4: Maková semínka [18]

2.2.5 Mandle

Mandlemi jsou nazývány plody mandloně obecné (*Prunus dulcis*), což je strom z čeledi růžovitých rostoucí především v subtropích a teplých oblastech mírného podnebného pásu [19].

Hořkost těchto plodů je závislá na množství kyanogenního glykosidu amygdalinu, což je pro lidský organismus prudce jedovatá látka. Hořké mandle z divoce rostoucích mandloní obsahují velká množství amygdalinu a olej z těchto mandlí je pro člověka smrtelný již ve velmi nízkých dávkách. Oproti tomu plody z vyšlechtěných mandloní jsou sladké a obsahují pouze 0,1 % amygdalinu, a proto se dále využívají v potravinářství a farmacii [20].

Mandle jsou až z 50 % své váhy tvořeny lipidy a jsou významným zdrojem polynenasycených a mononenasycených mastných kyselin. V mandlích je také velký obsah minerálů (mangan, hořčík, měď, fosfor) a vitamínů (vitamin E, vitamin B2), přičemž jsou bohaté také na vlákninu a proteiny [21].



Obrázek 5: Jádra mandlí [22]

2.2.6 Sezamová semínka

Sezam indický (*Sesamum indicum*) je rostlina patřící do čeledi sezamovitých (Pedaliaceae) a pěstuje se výhradně pro svá semena rostoucí v tobolkách, která jsou jedlá a mají široké využití v potravinářském i farmaceutickém průmyslu [23].

Sezamová semínka patří mezi nejstarší známá olejnatá semena a mohou dosahovat různého zbarvení od krémově bílé až po černou. Obsahují jedno z největších množství oleje mezi ostatními semeny a stejně jako jiné ořechy a pokrmy mohou způsobovat alergie [24].

Sezamový olej tvoří až 50 % váhy sezamových semínek a je složen především z mononenasycených (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Z dalších 23 % jsou poté sezamová semínka složena ze sacharidů a 18 % jejich váhy tvoří proteiny. Sezamová semínka jsou bohatá na vitamíny (vitamin B1, B2, B3, B6 a E) a minerály (vápník, železo, hořčík, fosfor, draslík, sodík, zinek) [23], [24].

Studie prokazují, že konzumace sezamových semínek napomáhá snižování vysokého krevního tlaku a studie sezamového oleje uvádějí, že právě tento olej snižuje množství oxidačních stresových markerů a peroxidaci lipidů [25], [26].



Obrázek 6: Sezamová semínka [27]

2.2.7 Fíky

Jako fíkovník (*Ficus*) označujeme keře, stromy nebo liány patřící do čeledi morušovníkovitých (*Moraceae*). Tento rod zahrnuje kolem 1 000 druhů a jeho zástupce nalezneme v tropech a subtropích celého světa. Druh fíkovníku, který poskytuje známé ovoce fíky, nazýváme fíkovník smokvoň (*Ficus carica*). Fíky jako takové jsou květenstvím, ve kterém rostou květy a semena zároveň. Jde tedy o uzavřený květ fíkovníku [28], [29].

Fíky jsou velmi výživné a využívají se v potravinářském i kosmetickém průmyslu. Řadí se mezi největší rostlinné zdroje vápníku a vlákniny a jsou bohaté na vitamíny, minerály, vodu a tuky. Obsahují vysoká množství anthokyanů a flavonoidů, které přispívají k charakteristickému zabarvení fíků a k regulaci signálních drah, které řídí buněčný metabolismus [30].

Fíky a další produkty (latex, kůra) fíkovníků lidé využívají již po staletí k léčbě nejrůznějších poruch, mezi které patří například gastrointestinální, zánětlivé a kardiovaskulární poruchy. Fíky mají také antivirové, antibakteriální a hypoglykemické účinky a využívají se například také jako laxativa nebo při léčbě rakoviny [30].



Obrázek 7: Čerstvé fíky [31]

2.2.8 Káva

Kávovník arabský (*Coffea arabica*) je rostlina patřící do čeledi mořenovitých (*Rubiaceae*) a z hlediska produkce kávy je nejvýznamnějším druhem kávovníku (*Coffea*). Plody tohoto stromu jsou ve zralém stavu červené až nařevovělé peckovice oválného tvaru obsahující 1 až 2 semena s podélnou rýhou [28].

Semena kávovníku obsahují přibližně 1,3 % bílkovin, 12 % tuků, 9 % sacharidů a obsah kofeinu může stoupnout až na 4 %, přičemž jeho obsah závisí na druhu kávových zrn (*Arabica* 0,8–1,4 % a *Robusta* 1,7–4 %). Hlavními složkami fenolické frakce zelených kávových semen jsou kyseliny chlorogenové (až 14 %) [32]. Kávová zrna obsahují velké množství minerálů (draslík, hořčík, vápník, sodík, železo, mangan, zinek, stroncium, chrom, vanad, kobalt, molybden, titan, kadmium, nikl, baryum) a vitamínů (B komplex). [33].

Kofein obsažený v kávě povzbuzuje srdeční činnost a zvyšuje krevní tlak. Káva je také spojována s nižší úmrtností na kardiovaskulární choroby a nižším výskytem rakoviny (zejména rakoviny prostaty, dělohy, kůže a jater). Byla prokázána také souvislost mezi pitím kávy

a lepším metabolickým zdravím, včetně sníženého výskytu diabetu typu 2. U kávy jsou potvrzeny také močopudné účinky [34], [35].



Obrázek 8: Pražená kávová zrna [36]

2.3 Antioxidační látky

Jako antioxidanty nazýváme látky, které jsou využívány organismy k ochraně proti volným radikálům. Ty se vytvářejí při normálních látkových přeměnách, ale také při nemoci, stárnutí nebo po nadměrném působení slunečního záření. Antioxidační vlastnosti rostlin jsou pak posuzovány především podle jejich schopnosti zachytávat volné radikály, které jsou nejčastěji připisovány právě fenolickým látkám. Díky tomu se v poslední době značně zvyšuje zájem o zjištění a popřípadě i navýšení obsahu fenolických látek v potravinářství [37].

Fenolické látky, nebo také fenoly, jsou v organické chemii označovány jako sloučeniny obsahující hydroxylovou funkční skupinu (-OH) navázanou přímo na aromatické jádro. Fenoly mohou těchto funkčních skupin obsahovat i více než jednu na jednom či více aromatických jádrech. Některé fenoly se díky svým baktericidním vlastnostem využívají při výrobě dezinfekčních přípravků (xylenol, fenol), jiné při výrobě výbušnin (kyselina pikrová), další fenolické látky jsou přirozenými neurotransmitery (serotonin, dopamin, adrenalin, noradrenalin). Některé fenolické látky dokonce zasahují do normálních funkcí endokrinního systému a mohou tak narušit fyziologické funkce endokrinních hormonů. Tyto látky se dají připravit jak synteticky, tak i extrakcí z různých druhů rostlin (kapsaicin, kofein) [38].

Lidský organismus je schopen vytvářet si antioxidační látky sám, ale příjem fytochemických sloučenin tělu poskytuje určité množství antioxidantů navíc, a proto jsou doplňkové zdroje těchto látek v potravě či kosmetice velmi důležité [37].

Většina polyfenolů, především pak flavonoidy, jsou velmi účinnými akceptory zejména hydroxylových a peroxylových radikálů. Polyfenoly jsou schopny vytvářet chelátové vazby s kovy a inhibovat tak Fentonovu a Haber-Weissovu reakci, které jsou považovány za velmi důležitý zdroj aktivních kyslíkových radikálů. Nápoje rostlinného původu, jako jsou například káva nebo čaj, jsou dobrým zdrojem biologicky aktivních sloučenin, jako jsou vitamíny, minerály a různé fenolické sloučeniny [39].

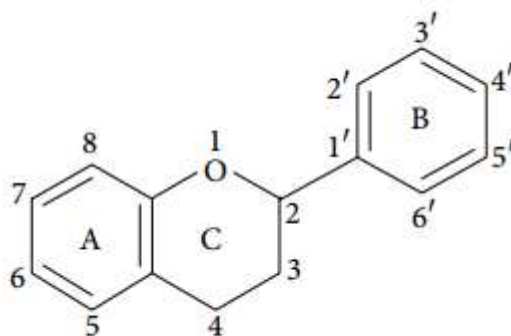
2.3.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou považovány za jednu z největších skupin fytochemických látek a obsahují ve své struktuře benzenové jádro s hydroxylovými skupinami. Největší zastoupení polyfenolů nalezneme v zeleném čaji, ale nalézáme je také v kávě, oříšcích či jiných plodech a listech rostlin. Tyto látky mají pozitivní vliv na lidské zdraví a působí proti různým chronickým onemocněním. Používají se také při prevenci vzniku rakoviny, cukrovky a kardiovaskulárních onemocnění [40].

Rozlišujeme čtyři hlavní skupiny polyfenolů. Jsou to fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. Flavonoidy činí asi dvě třetiny celkového příjmu polyfenolů, fenolové kyseliny přibližně jednu třetinu a ostatní polyfenoly tvoří minoritní stopový podíl příjmu polyfenolů [41].

2.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu polyfenolů, které jsou schopné tvořit sloučeniny, které obsahují flavanový cyklický skelet. Tento skelet je tvořen dvěma substituovanými benzoovými kruhy (A,B) a pyranovým kruhem C, který je napojený na kruh A. Heterocyklus C obsahuje jeden atom kyslíku, který zodpovídá za typické reakce flavonoidů [42].



Obrázek 9: Flavanový skelet [43]

Na pyranový kruh může být fenyl B napojen v pozici 2, a potom sloučenina spadá mezi normální flavonoidy, mezi které patří většina flavonoidních barviv. Dále může být tento fenyl napojen v pozici 3, a potom sloučeniny označujeme jako isoflavonoidy, od nichž jsou dále odvozovány insekticidy některých rostlin (roteniny). V neposlední řadě může být fenyl B napojen na pyranový kruh v pozici 4, a tyto sloučeniny pak nazýváme neoflavoniny. Další klasifikaci ovlivňuje oxidace pyranového kruhu, a spadají sem skupiny flavanů, flavolanů, flavonů, flavonolů, anthokyaninů nebo třeba chalconů [42].

Nejdůležitější z těchto skupin flavonoidů je skupina flavonolů, mezi jejíž zástupce patří katechiny, které jsou součástí barevných flavonoidů (flavony, anthokyaniny) a kondenzovaných taninů [42].

Flavonoidy také vykazují velmi vysoké antioxidační účinky, kdy přitahují volné radikály, a tím chrání buňky lidského organismu před toxickým působením škodlivých látek. Tyto účinky se využívají převážně v medicíně při léčbě infekcí a v kosmetickém průmyslu při výrobě nejrůznějších kosmetických přípravků [44].

2.3.3 Celková antioxidační aktivita

Literatura popisuje celou řadu metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity, které jsou založeny na různých mechanismech působení nízkomolekulárních antioxidantů a pro charakterizaci souhrnné koncentrace všech látek s antioxidačními účinky obsažených ve vzorku se využívá označení celková antioxidační kapacita (TAA)[45][46].

V této práci se využívá ke stanovení celkové antioxidační aktivity metoda TEAC.

2.3.3.1 Metoda TEAC

Antioxidační aktivitu extraktů lze změřit pomocí metody TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay).

Jako ABTS se označuje peroxidázový substrát vytvářející pomocí reakce s peroxylovými radikály nebo jinými oxidačními látkami za přítomnosti vody metastabilní radikál - kation $ABTS^{\bullet+}$ ((2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát))). Tato metoda spočívá ve schopnosti zachytávat a zhaset modrozelený radikálový kation $ABTS^{\bullet+}$. Výsledná antiradikálová aktivita je následně srovnávána s antiradikálovou aktivitou Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je syntetický derivát vitamínu E rozpustný ve vodě [46], [47], [48].

Antioxidanty chovající se jako donory vodíku zhasí radikál $ABTS^{\bullet+}$ a tento jev lze sledovat spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Kation-radikál se v reakční směsi generuje oxidací ABTS [46].

2.4 Mastné kyseliny

Jako mastné kyseliny označujeme karboxylové kyseliny se 4 až 26 uhlíky v řetězci, tedy vyšší monokarboxylové kyseliny. Z důvodu syntézy z dvojuhlíkových jednotek acetyl-CoA obsahují tyto kyseliny většinou sudý počet uhlíkových atomů. V přírodě je nalezneme buď volné (FFA-free fatty acids) nebo inkorporované do struktury lipidů (ve formě esterů s alkoholy – glycerolem, sfingosinem, cholesterolem) či vosků (ve formě esterů s cetylalkoholem a myristylalkoholem) [49], [50].

Mastné kyseliny jsou amfipatické povahy a působí jako tenzidy, a tedy látky snižující povrchové napětí. Rozpustnost mastných kyselin ve vodě klesá spolu s délkou jejich uhlíkatého řetězce, přičemž jediná poměrně dobře ve vodě rozpustná mastná kyselina je kyselina máselná[49]. Volné mastné kyseliny ve vodním prostředí poměrně snadno disociují a jsou relativně dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech [50].

V organismech mají mastné kyseliny strukturní funkci jako součást fosfolipidů v buněčných membránách a glykolipidy v nervové tkáni. Dále se v organismech vyskytují ve formě derivátů eikosapolyenových mastných kyselin (eikosanoidů), což jsou vnitrobuněčné signalizační molekuly ovlivňující stahy svalů, záněty či samotné srážení krve [51].

2.4.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny (SFA-„saturated fatty acids“) ve svém uhlíkatém řetězci neobsahují žádné násobné vazby. Mezi nasycené mastné kyseliny patří například kyselina myristová, kyselina palmitová a kyselina stearová [41]. Nasycené mastné kyseliny se vyskytují ve velkém množství jako energetická rezerva v živočišných tukách a mimo jiné se vyskytují také

v palmovém oleji. Vážou se na VLDL lipoproteiny („very low density lipoprotein“) a jejich pomocí jsou distribuovány ven z jater [49].

2.4.2 Mononenasyčené mastné kyseliny

Mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA-„monounsaturated fatty acids“) obsahují ve svém uhlíkatém řetězci jednu dvojnou vazbu. Mezi mononenasyčené mastné kyseliny patří například kyselina palmitolejová, kyselina olejová a kyselina nervonová [42].

2.4.3 Polynenasycené mastné kyseliny

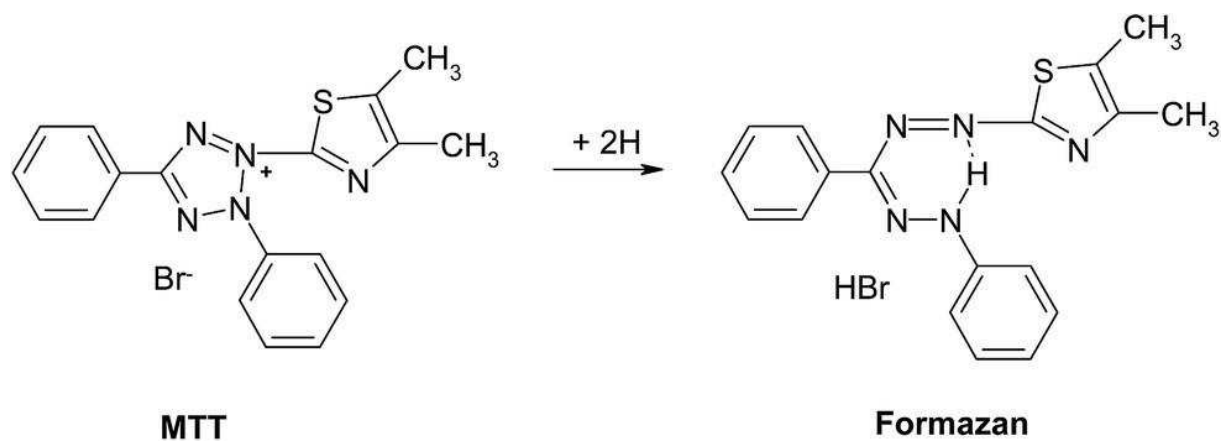
Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA-„polyunsaturated fatty acids“) obsahují ve svém uhlíkatém řetězci dvě a více dvojných vazeb, přičemž tyto vazby nejsou konjugované, ale izolované – oddělené methylenovými skupinami. Mezi polynenasycené mastné kyseliny patří například kyselina linolová (C18:2), kyselina γ -linolenová (C18:3) a kyselina arachidonová (C20:4). Mezi polynenasycené mastné kyseliny patří i esenciální mastné kyseliny (kyselina linolová, kyselina α -linolenová). Některé polynenasycené mastné kyseliny ovlivňují množství LDL („low density lipoprotein“) v krvi a pomáhají tím snižovat hladinu cholesterolu (především omega-3 nenasycené mastné kyseliny) [42], [49].

2.5 Cytotoxické testy

Všechny materiály, které mají být použity jako aktivní složky pro zlepšení fyziologických funkcí do lidského organismu, musí být nutně otestovány, a to na několik různých faktorů. Mezi tyto faktory patří toxicita pro buňky a tkáně, karcinogenita a vyvolání nežádoucích imunitních reakcí v případě jejich přítomnosti. Ke zjištění nezávadnosti materiálů potom slouží cytotoxické testy, díky kterým zjišťujeme, zda určité látky nejsou toxické pro buňky lidského organismu [52].

2.5.1 MTT test

MTT, tedy 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid, je žlutý prášek tetrazoliové soli. MTT test cytotoxicity je kolorimetrická metoda, při které je MTT redukován v živých buňkách mitochondriálními dehydrogenázami na fialově-modrý formazan. Před samotným měřením je však nutné krystaly formazanu rozpustit a množství formazanu je poté vyhodnocováno spektrofotometricky a ukazuje nám míru životaschopnosti buněk. Hodnota absorpance roztoku odpovídá množství živých buněk, a tedy čím tmavší barva, tím více živých buněk je ve vzorku. Mezi nevýhody tohoto testu patří nedostatečná redukce MTT a jeho možné ovlivňování různými parametry, jako je třeba pH média [52].



Obrázek 10: Redukce MTT na formazan [43]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je studium aktivních složek a biologických účinků vybraných druhů rostlinných materiálů s vyšším obsahem oleje. Součástí práce je řešení následujících dílčích úloh:

- Výběr studovaných rostlinných materiálů a charakterizace jejich složek
- Stanovení antioxidačních účinků lipidických extraktů a jejich složení
- Testování biologických účinků extraktů na lidských buněčných kulturách

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité na přípravu extraktů

- Ethanol, Lach-Ner (CZE)
- Hexan, Lach-Ner (CZE)

4.1.2 Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovení

- Folin-Ciocalteu roztok, Penta s.r.o. (CZE)
- Uhličitan sodný bezvodý, Lach-Ner (CZE)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DEU)
- Dusitan sodný, Lach-Ner (CZE)
- Chlorid hlinitý hexahydrát, Lach-Ner (CZE)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner (CZE)
- Katechin, Sigma-Aldrich (DEU)

4.1.3 Chemikálie použité na stanovení antioxidační aktivity

- ABTS, Sigma-Aldrich (DEU)
- Peroxosíran draselný, Sigma-Aldrich (DEU)
- Trolox, Sigma-Aldrich (DEU)

4.1.4 Chemikálie použité pro práci s buňkami

- Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza (USA)
- Dodecylsírán sodný, Serva (DEU)
- MTT, Duchefa Biochemie (NLD)
- Trypsin Versene EDTA, P-Lab (CZE)
- FBS, HyClone (USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrium-LachNer (CZE)
- Chlorid sodný p.a., Vitrium-LachNer (CZE)
- Antibiotic-Antimycotic 100X(Biosera), Biotech (DEU)

4.1.5 Chemikálie použité na stanovení mastných kyselin

- Chloroform, Lach-Ner (CZE)
- Kyselina sírová, Lach-Ner (CZE)
- Methanol, Lach-Ner (CZE)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco Germany (SRN)
- Soxterm, Gerhardt (DEU)
- Vortex TK3S, Kartell spa (USA)
- GC sestava
 - Autoinjektor AI 1310 ThermoFisher Scientific (USA)
 - Plynový Chromatograf Trace 1300 ThermoFisher Scientific (USA)
 - Kapilární kolona ZB-FAME o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,20 μm

- YODA Home Pro, lisování olejů za studena, Hangzhou Yoda Scientific and Technological Co. Ltd (CZE)
- Centrifuga, Sartorius Sigma (DEU)
- Biochrom WPA Biowave II UV/Visible Spectrophotometer with Life Science Methods, WPA Biochrom (UK)
- CellCulture CO2 inkubátor, ESCO (DEU)
- Biohazard box, model Airstream, třída II, ESCO (DEU)
- Inverzní biologický mikroskop i-101 LW Scientific, Laboserv (CZE)
- Automatické pipety v různém rozsahu objemu, Discovery (SRN) a Biohit (DEU)

4.3 Optimalizace přípravy přírodních extraktů

Z kokosu, máku, dýňových semínek, vlašských ořechů, sezamu, mandlí, fíkových semínek a mleté kávy byly připraveny vodné, ethanolové a hexanové extrakty. Z kokosu, máku, dýňových semínek, vlašských ořechů, sezamu a mandlí byly za studena vylisovány oleje pomocí lisu YODA.

4.3.1 Příprava vodných extraktů

Na přípravu vodných extraktů byl použit 1,0 g odváženého vzorku. K tomuto množství vzorku bylo přidáno 10 ml destilované vody a bylo ponecháno 24 hodin louhovat. Po uplynutí této doby byl výluh zcentrifugován a slit do čisté plastové zkumavky.

4.3.2 Příprava ethanolových extraktů

Na přípravu ethanolových extraktů byl použit 1,0 g odváženého vzorku. K tomuto množství bylo přidáno 10 ml roztoku ethanolu a bylo ponecháno 24 hodin louhovat. Po uplynutí této doby byl výluh zcentrifugován a slit do čisté plastové zkumavky. Byly připraveny extrakty z těchto roztoků ethanolu ve vodě: 20 %, 40 %, 60 % a 80 %.

4.3.3 Příprava hexanových extraktů

Extrakce do hexanu probíhala na přístroji Soxterm. Do extrakční patry bylo naváženo 10 g suchého homogenizovaného vzorku. Obsah patry byl utěsněn buničitou vatou a přelit 150 ml hexanu. Následně byl spuštěn přístroj. Po skončení extrakce byl zbylý hexan odpařen na vakuové rotační odparce a výsledné extrakty byly uschovány v mrazáku při teplotě -15°C pro stanovení mastných kyselin.

4.3.4 Příprava olejových extraktů

Do lisu na oleje bylo nasypáno 100 g vybraného přírodního vzorku. Po vylisování byl olej zvážen a uschován v chladničce při teplotě 5°C pro stanovení mastných kyselin.

4.4 Charakterizace extraktů

U připravených extraktů byl stanoven obsah celkových polyfenolů, flavonoidů a antioxidační účinek. U hexanových extraktů bylo dále zkoumáno složení mastných kyselin a proporcionální zastoupení SFA, MUFA a PUFA.

4.4.1 Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů

Byla sestavena kalibrační přímka z naředěné kyseliny gallové o koncentraci 0,1–0,7 mg·ml⁻¹. Do zkumavek byl napipetován 1 ml destilované vody, 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 50 µl standardu. Roztoky byly promíchány na vortexu a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Roztoky byly opět promíchány na vortexu a po 15 minutách byla změřena absorbance při 750 nm. Slepý vzorek obsahoval místo kyseliny gallové destilovanou vodu. Extrakty byly připraveny a proměřovány obdobným způsobem, kdy místo kyseliny gallové bylo přidáno 50 µl vodného extraktu nebo ethanolového extraktu.

V programu MS Excel byla sestavena kalibrační přímka a zobrazena hodnota spolehlivosti.

$$y = 0,3813 \cdot x \quad (1)$$

$$R^2 = 0,9984 \quad (2)$$

4.4.2 Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů

Byl připraven zásobní roztok katechinu o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Pro sestavení kalibrační řady bylo připraveno šest roztoků v rozmezí 0,05–0,30 mg·ml⁻¹. Do zkumavek bylo napipetováno 1,5 ml destilované vody, 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného a 0,5 ml naředěného katechinu. Roztoky byly promíchány na vortexu, a po 5 minutách bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Roztoky byly opět promíchány a ponechány 5 minut stát. Po uplynutí této doby bylo přidáno 1,5 ml 5% roztoku hydroxidu sodného a 1 ml vody. Roztoky byly opět promíchány na vortexu, a po 15 minutách byla změřena absorbance při 510 nm. Slepý vzorek obsahoval namísto vzorku destilovanou vodu.

V programu MS Excel byla sestavena kalibrační přímka a zobrazena hodnota spolehlivosti.

$$y = 2,3107 \cdot x \quad (3)$$

$$R^2 = 0,9992 \quad (4)$$

4.4.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS

Nejprve byl připraven kation ABTS^{•+} tak, že byl rozpuštěn ABTS ve vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kation byl připraven přidáním peroxodisíranu draselného na konečnou koncentraci 3,45 mM. Tento připravený roztok byl ponechán 12 hodin ve tmě. Před použitím byl ABTS^{•+} zředěn ethanolom na absorbanci 0,700±0,02, měření bylo při vlnové délce 734 nm proti ethanolu. Před začátkem měření byla zjištěna hodnota A₀ z 1 ml ABTS^{•+} s 10 µl destilované vody, od které se pak další naměřené hodnoty absorbance odečítaly. Samotné měření probíhalo v zúžené kyvetě, kdy byl přidán 1 ml ABTS^{•+} s 10 µl standardu či vzorku a byl sledován pokles absorbance. Po 10 minutách byla daná absorbance zaznamenána. Pro sestavení kalibrační řady byl naředěn roztok Troloxu na rozmezí koncentrací 50–400 µl·ml⁻¹, který byl rozpuštěn v 60% ethanolu. Slepý vzorek byl ethanol.

V programu MS Excel byla sestavena kalibrační přímka a zobrazena hodnota spolehlivosti.

$$y = -0,0004 \cdot x + 0,689 \quad (5)$$

$$R^2 = 0,9244 \quad (6)$$

4.4.4 Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie

Vzorky lipidických extraktů byly rozpuštěny v chloroformu tak, aby jejich koncentrace byla mezi 5–12 mg·ml⁻¹. Vzniklé roztoky byly použity na transesterifikaci.

Do krymplovací vialky byl napipetován 1 ml vzorku rozpuštěného v chloroformu a bylo přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi o složení: 15% kyselina sírová v methanolu a vnitřní standard C17. Takto připravené vialky byly zakrymplovány, promíchány a inkubovány v termobloku po dobu 2 hodin při 85 °C. Po proběhnutí transesterifikace se nechaly vialky volně vychladnout.

Do 4 ml vialek bylo napipetováno 0,5 ml 0,05M roztoku NaOH a do něj byl kvantitativně převeden obsah vialky po transesterifikaci. Vialka byla uzavřena a vzorek byl extrahován 3–5 minut na multipozičním vortexu.

Po oddělení fází bylo z organické fáze odebráno 0,1 ml a toto množství bylo převedeno do čisté GC vialky s 0,9 ml čistého chloroformu. Takto připravené roztoky byly použity pro plynovou chromatografii.

4.5 Kultivace humánních keratinocytů linie HaCaT

Buňky byly kultivovány v komerčním médiu DMEM. Práce s buňkami probíhala vždy za sterilních podmínek. Buňky byly kultivovány ve speciálních rukavicích v inkubátoru při teplotě 37 °C, obsahu CO₂ 5 % a relativní vlhkosti 90 %.

Po vytažení buněk z inkubátoru byly před každou následující prací zkontrolovány jednotlivé lahvičky pod inverzním mikroskopem. Byl sledován celkový stav buněk, jejich morfolgie, množství a případné kontaminace. Podle množství buněk bylo buď vyměněno médium (každé dva dny), nebo v případě vysokého procenta konfluence byly buňky pasážovány.

Při výměně média bylo staré médium odstraněno do odpadní nádoby a nahrazeno novým. Při pasážování bylo médium také odstraněno, buňky byly dvakrát propláchnuty 5 ml fosfátového pufru. Po propláchnutí byla přidána proteáza trypsin, bylo otáčeno lahvičkou tak, aby roztok enzymu pokryl celý povrch kultivační nádoby a poté byla lahvička s enzymem vložena do kultivačního boxu na 10 minut. Po uplynutí této doby bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda se buňky odloučily ode dna lahvičky. Do centrifugačních zkumavek bylo napipetováno 5 ml fosfátového pufru. Buňky byly z lahviček kvantitativně převedeny pomocí pufru do centrifugačních zkumavek a centrifugovány 5 minut při 360 g (RCF). Následně byl opatrně slit supernatant tak, aby pelet buněk zůstal usazen na dně. Buňky byly rozsuspendovány v novém médiu a přeneseny do nové kultivační lahvičky, případně do více lahviček. Médium v nové lahvičce bylo doplněno na požadovaný objem. Na závěr byly buňky opět zkontrolovány pod mikroskopem a vráceny do inkubátoru.

4.6 MTT test cytotoxicity

Po nárůstu buněk na dostatečné množství byly použity k testování cytotoxicity použitím MTT testu. První kroky MTT byly zpočátku obdobné jako u pasážování buněk (4.5). Po centrifugaci a slití supernatantu byl ke každé peletce napipetován 1 ml média, v němž byly buňky rozsuspendovány. Následně byla spočítána koncentrace buněk obarvením trypanovou modří v Bürkerově komůrce.

Buňky byly vhodně zředěny médiem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla $2 \cdot 10^4$ buněk/100 μ l. Takto připravená suspenze byla pipetována po 100 μ l na 96 jamkovou destičku. Destička byla zkontrolována pod mikroskopem, a na 24 hodin byla destička dána do inkubátoru. Poté bylo z jamek odpipetováno médium a přidáno 100 μ l vzorku do každé jamky v různých koncentracích. Následně byla destička vrácena na 24 hodin do inkubátoru.

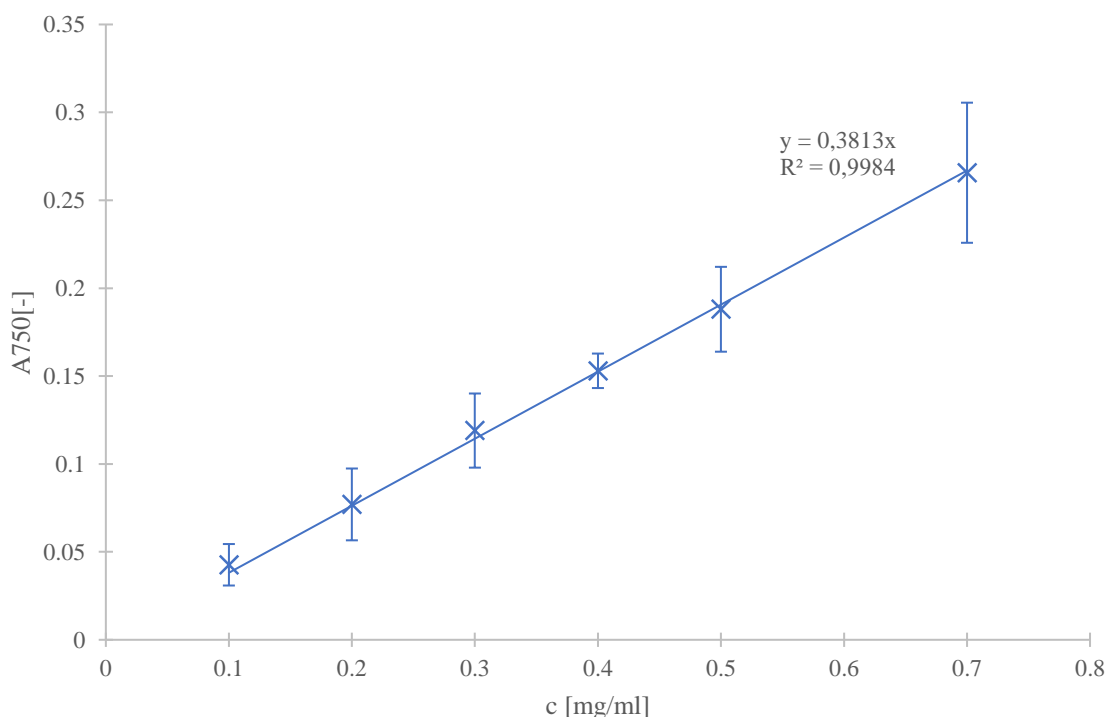
Po uplynutí 24 hodin byl odpipetován vzorek a do každé jamky bylo napipetováno 20 μl MTT o koncentraci $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v PBS.

Buňky byly nechány ke kultivaci v inkubátoru po dobu 3 hodin. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 100 μl 10% SDS v PBS. Destička byla ponechána ve tmě při laboratorní teplotě na dalších 24 hodin. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm a vypočítána viabilita buněk jako procentuální podíl vůči kontrole.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů

Pro stanovení obsahu polyfenolů v připravených extraktech byla sestavena kalibrační závislost kyseliny gallové dle návodu v kapitole 4.4.1, která je znázorněna v grafu 1. Vzorky každé koncentrace byly připraveny a měřeny v triplikátech a z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatné odchylky. Výpočty byly provedeny v programu MS Excel.



Graf 1: Kalibrační přímka kyseliny gallové

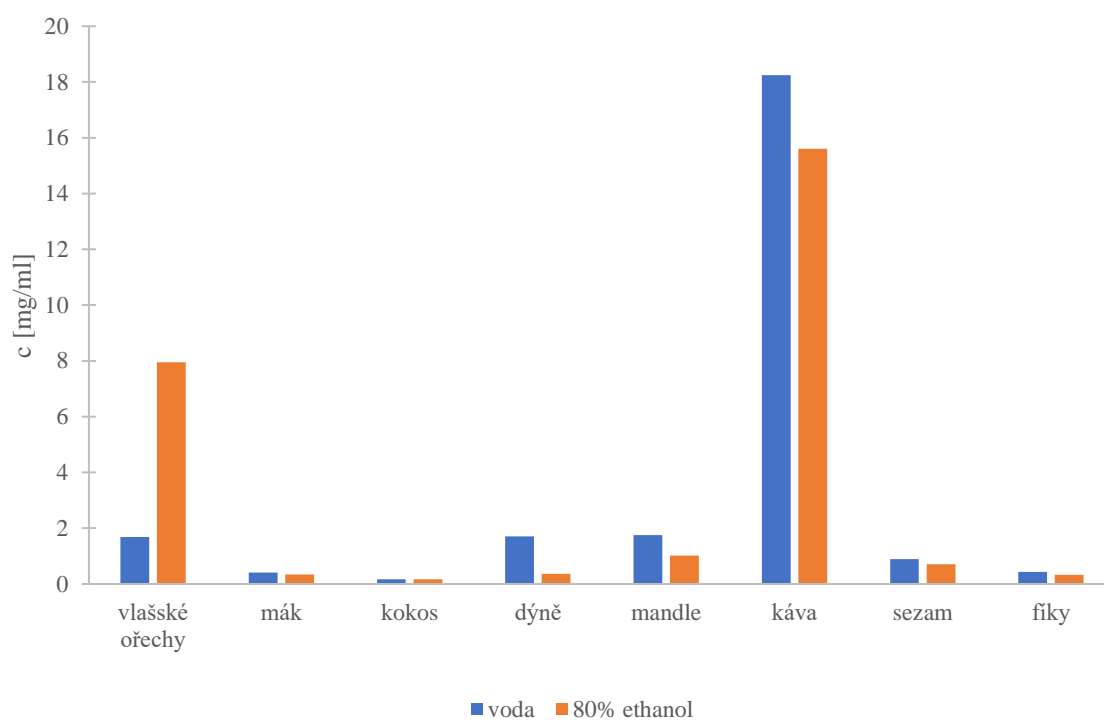
5.1.1 Obsah polyfenolů v extraktech

Celkový obsah polyfenolů byl vypočítáván v mg polyfenolů na 1 g suchého vzorku.

Obsah polyfenolů ve vodných extraktech vybraných druhů rostlin byl nejvyšší u kávy ($18,24 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Mandle a dýně obsahovaly shodně okolo $1,7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Nejnižší byl potom u kokosu ($0,17 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

Obsah polyfenolů v ethanolových extraktech byl nejvyšší u kávy ($15,60 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a vlašských ořechů ($7,96 \pm 0,19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), nejnižší u kokosu ($0,17 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a fíků ($0,33 \pm 0,01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), přičemž jak u kávy, tak u vlašských ořechů bylo nejvyšší množství vypočítáno vždy pro vzorek v 80% ethanolu.

U vlašských ořechů, kokosu, mandlí a seznamu bylo dosaženo vyšší hodnoty obsahu polyfenolů u ethanolových extraktů, jinak bylo všeobecně vyšší hodnoty dosahováno u vodných extraktů. Všechny výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Výpočty byly provedeny v programu MS Excel.



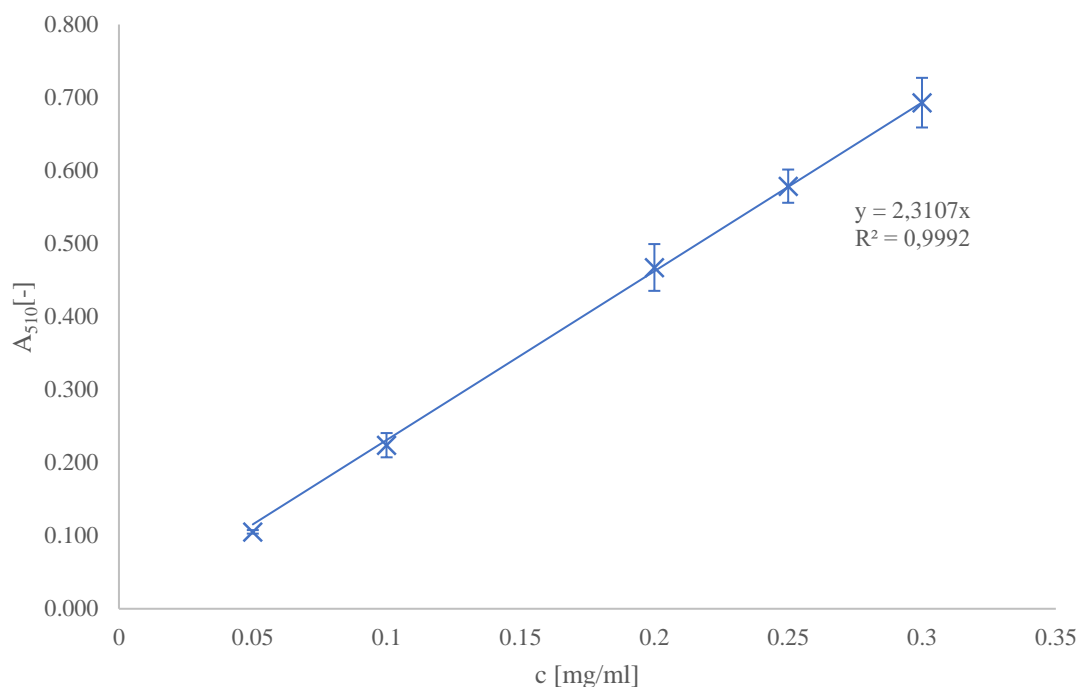
Graf 2: Obsah polyfenolů jednotlivých extraktů ve vodě a 80% roztoku ethanolu

Tabulka 1: Obsah celkových polyfenolů v extraktech

extrakt	Obsah polyfenolů ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)				
	H ₂ O	20% etOH	40% etOH	60% etOH	80% etOH
Mák	0,41±0,03	0,29±0,05	0,35±0,04	0,26±0,15	0,34±0,01
Kokos	0,17±0,04	0,35±0,11	0,20±0,03	0,31±0,02	0,17±0,01
Dýně	1,71±0,26	0,89±0,06	0,55±0,02	0,34±0,05	0,36±0,06
Mandle	1,76±0,36	2,02±0,11	0,97±0,01	1,01±0,08	1,02±0,05
Vlašské ořechy	1,69±0,03	6,93±0,03	3,53±0,09	3,42±0,03	7,96±0,20
Káva	18,24±0,03	11,48±0,03	14,35±0,06	12,19±0,05	15,60±0,08
Sezam	0,89±0,19	1,15±0,08	0,50±0,03	0,45±0,02	0,71±0,04
Fíky	0,43±0,02	0,33±0,01	0,31±0,02	0,28±0,02	0,33±0,01

5.2 Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů

Pro stanovení obsahu flavonoidů v připravených extraktech byla sestavena kalibrační závislost katechinu dle návodu v kapitole 4.4.2, která je znázorněna v grafu 2. Vzorky každé koncentrace byly připraveny a proměřeny vždy třikrát a z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatné odchylky. Výpočty byly provedeny v programu MS Excel.



Graf 3: Kalibrační přímka katechinu

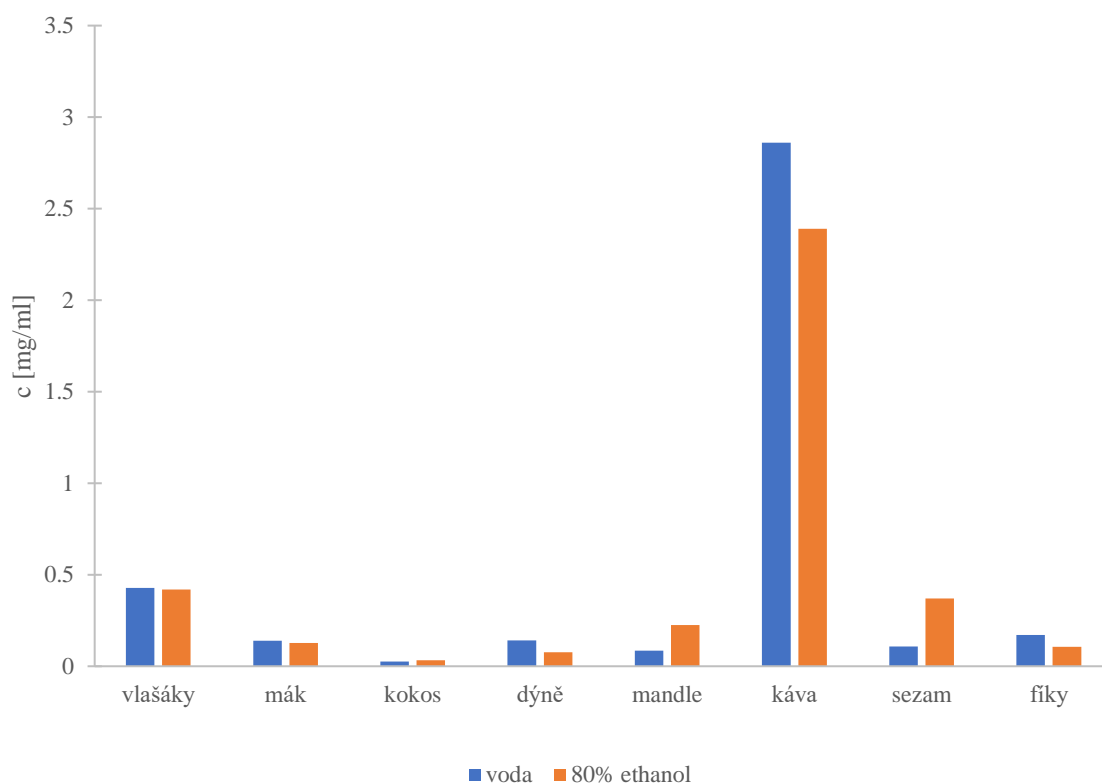
5.2.1 Obsah flavonoidů v extraktech

Celkový obsah flavonoidů byl vypočítáván v mg flavonoidů na 1 g suchého vzorku.

Obsah flavonoidů ve vodných extraktech vybraných druhů rostlin byl nejvyšší u kávy ($2,861 \pm 0,004 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a vlašských ořechů ($0,427 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), nejnižší byl potom u kokosu ($0,026 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a mandlí ($0,085 \pm 0,006 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

Obsah flavonoidů v ethanolových extraktech byl nejvyšší u kávy ($2,763 \pm 0,011 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a vlašských ořechů ($0,420 \pm 0,005 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), nejnižší potom u kokosu ($0,033 \pm 0,001 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a dýně ($0,077 \pm 0,012 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), přičemž nejvyšší množství u daného vzorku bylo vypočítáno vždy pro vzorek v 80% ethanolu, výjimku tvořila pouze dýně.

U kokosu, mandlí a seznamu bylo dosaženo vyšší hodnoty obsahu flavonoidů u ethanolových extraktů, jinak bylo všeobecně vyšší hodnoty dosahováno u vodných extraktů. Všechny výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Výpočty byly provedeny v programu MS Excel.



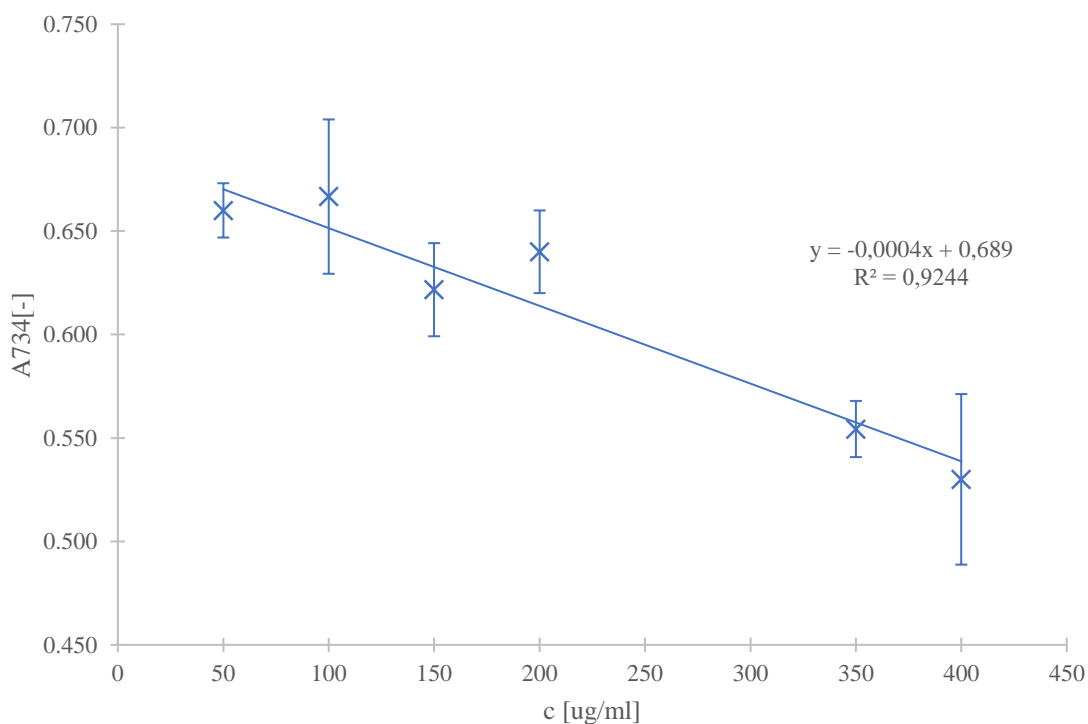
Graf 4: Obsah flavonoidů jednotlivých extraktů ve vodě a 80% roztoku ethanolu

Tabulka 2: Obsah celkových flavonoidů v extraktech

extrakt	Obsah flavonoidů ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)				
	H ₂ O	20% etOH	40% etOH	60% etOH	80% etOH
Mák	0,139±0,003	0,061±0,007	0,087±0,004	0,101±0,005	0,127±0,007
Kokos	0,026±0,002	0,029±0,001	0,017±0,001	0,021±0,001	0,033±0,001
Dýně	0,141±0,001	0,127±0,002	0,054±0,005	0,056±0,005	0,077±0,012
Mandle	0,085±0,006	0,224±0,009	0,061±0,001	0,178±0,002	0,225±0,002
Vlašské ořechy	0,427±0,002	0,312±0,004	0,320±0,007	0,370±0,006	0,420±0,005
Káva	2,861±0,004	2,763±0,011	2,522±0,019	2,571±0,006	2,390±0,005
Sezam	0,107±0,005	0,144±0,023	0,084±0,005	0,010±0,001	0,370±0,010
Fíky	0,171±0,002	0,054±0,002	0,034±0,001	0,048±0,001	0,107±0,002

5.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro stanovení obsahu flavonoidů v připravených extraktech byla sestavena kalibrační závislost katechinu dle návodu v kapitole 4.4.3, která je znázorněna v grafu 3. Vzorky každé koncentrace byly připraveny a proměřeny vždy třikrát a z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatné odchylky. Výpočty byly provedeny v programu MS Excel.



Graf 5: Kalibrační přímka Troloxu

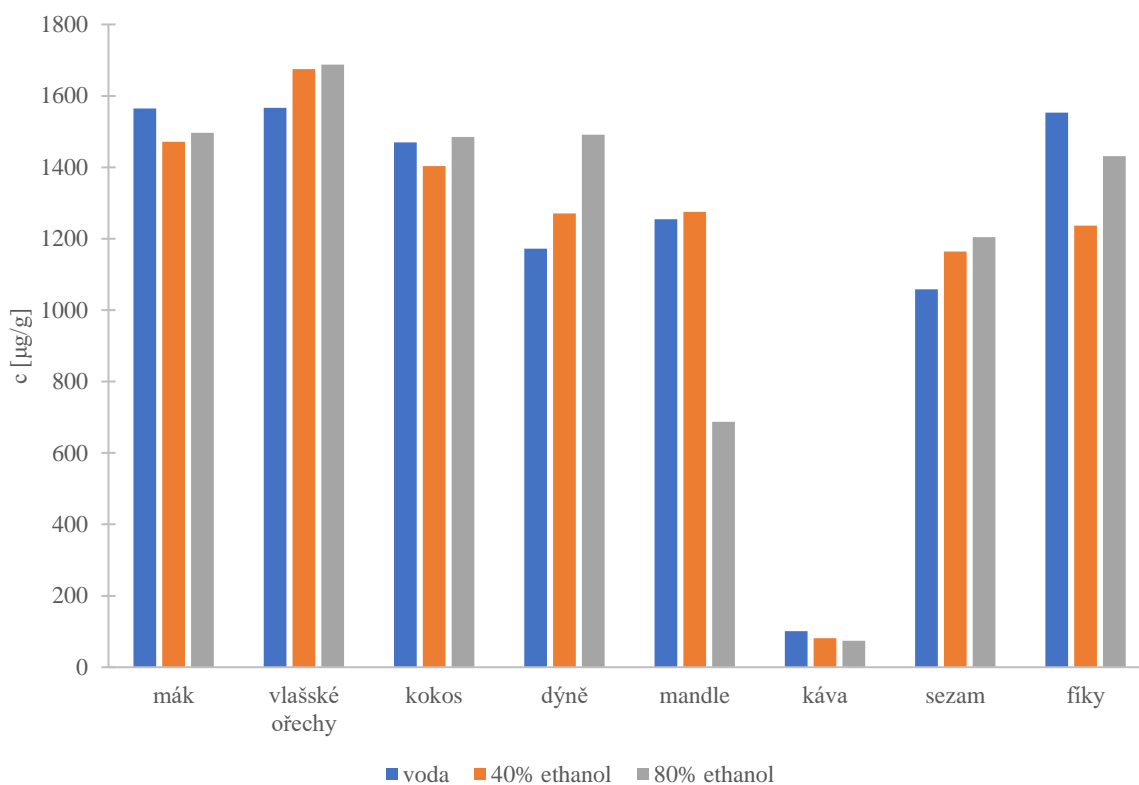
5.3.1 Celková antioxidační aktivita

Celková antioxidační aktivita byla vypočítána v μg flavonoidů na 1 g suchého vzorku.

Celková antioxidační aktivita ve vodných extraktech vybraných druhů rostlin byla nejvyšší u vlašských ořechů ($1\,566,67 \pm 0,05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) a máku ($1\,565,00 \pm 0,01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), nejnižší byl potom u kávy ($100,83 \pm 0,01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

Celková antioxidační aktivita v ethanolových extraktech byla potom taktéž nejvyšší u vlašských ořechů ($1\,687,50 \pm 0,01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) a máku ($1\,496,67 \pm 0,02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), nejnižší potom u kávy ($74,17 \pm 0,01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) a mandlí ($687,50 \pm 0,01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

U většiny vzorků byla zjištěna vyšší antioxidační aktivita v případě ethanolových extraktů až na mák a fíky, které měly nejvyšší antioxidační aktivitu při extrakci pomocí destilované vody. Všechny výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Výpočty byly provedeny v programu MS Excel.



Graf 6: Srovnání antioxidační aktivity pro vodné a vybrané ethanolové extrakty

Tabulka 3: Celková antioxidační aktivita extraktů

extrakt	Celková antioxidační aktivita ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	H ₂ O	20% etOH	40% etOH	60% etOH	80% etOH
Mák	1 565,00±0,01	1 525,83±0,01	1 471,67±0,04	1 500,00±0,02	1 496,67±0,02
Kokos	1 470,00±0,01	1 486,67±0,03	1 403,33±0,04	1 460,83±0,01	1 485,00±0,02
Dýně	1 172,5±0,03	1 031,67±0,01	1 270,83±0,04	1 401,67±0,01	1 490,83±0,03
Mandle	1 254,17±0,02	1 284,17±0,04	1 275,00±0,01	892,50±0,02	687,50±0,01
Vlašské ořechy	1 566,67±0,05	1 670,83±0,01	1 675,00±0,01	1 690,00±0,01	1 687,50±0,01
Káva	100,83±0,01	97,50±0,01	81,67±0,01	95,00±0,01	74,17±0,01
Sezam	1 058,33±0,02	1 063,33±0,01	1 164,17±0,02	1 343,33±0,01	1 204,17±0,01
Fíky	1 553,33±0,05	1 266,67±0,03	1 236,67±0,03	1 334,17±0,02	1 430,83±0,02

5.4 Stanovení mastných kyselin

U extraktů byla provedena transesterifikace podle kapitoly 4.4.4, a vzorky byly podrobeny kvantifikaci pomocí GC. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 4. Výpočty byly provedeny v MS Excel.

Nejvyšší obsah celkových mastných kyselin byl pozorován u vlašských ořechů ($1,653 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a máku ($1,433 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Naopak nejméně celkových mastných kyselin bylo pozorováno u extraktů získaných z fíků ($0,165 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a kávy ($0,607 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Jasně nejvyšší obsah nasycených mastných kyselin bylo zjištěno u extraktu z kokosu ($1,045 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a nejméně jich bylo pozorováno u mandlí ($0,137 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), přičemž u většiny extraktů se hodnota pohybovala kolem $0,250 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Mononenasycených mastných kyselin bylo největší množství pozorováno u extraktu z mandlí ($0,808 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a nejméně jich bylo zjištěno u fíků ($0,004 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Polynenasycené mastné kyseliny převažovaly u extraktu z vlašských ořechů ($1,105 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a nejméně jich bylo sledováno u sezamu ($0,012 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), přičemž u kokosu, fíků a kávy nebyly detekovány žádné z těchto kyselin.

Tabulka 4: Celkové množství mastných kyselin

Celkové množství mastných kyselin [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]				
vzorek	SFA	MUFA	PUFA	celkem
Mák	0,201	0,213	1,019	1,433
Dýně	0,282	0,384	0,718	1,386
Vlašské ořechy	0,207	0,341	1,105	1,653
Kokos	1,045	0,062	ND	1,107
Mandle	0,137	0,808	0,013	0,960
Sezam	0,204	0,431	0,012	0,647
Fíky	0,161	0,004	ND	0,165
Káva	0,341	0,266	ND	0,607

Mastné kyseliny byly ve výsledcích rozděleny podle počtu násobných vazeb a bylo zjištěno jejich procentuální složení podle saturace. U extraktů z máku, vlašských ořechů a dýňových semínek převládaly polynenasycené mastné kyseliny. U extraktů z kokosu, kávy a fíkových semínek převládaly nasycené mastné kyseliny. U extraktů ze sezamu a mandlí potom převládaly mononenasycené mastné kyseliny. Dále jsou uvedeny grafy s procentuálním zastoupením jednotlivých druhů mastných kyselin pro jednotlivé vzorky a hlavní mastné kyseliny obsažené v dané frakci.

5.4.1 Maková semínka

Maková semínka obsahovala převážně polynenasycené mastné kyseliny, které tvořily přes 70 % celkových mastných kyselin. O zbylý obsah se pak rovnoměrně dělily nasycené mastné

kyseliny a mononenasycené mastné kyseliny. Procentuální složení mastných kyselin obsažených v máku je uvedeno v grafu 7.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina palmitová, kyselina stearová
- MUFA: kyselina palmitolejová, kyselina olejová
- PUFA: kyselina linolaidová, kyselina linolová

5.4.2 Dýňová semínka

Dýňová semínka obsahovala převážně polynenasycené mastné kyseliny, které tvořily přes 50 % celkových mastných kyselin. Mononenasycených mastných kyselin bylo pozorováno 27 % a nejmenší zastoupení měly nasycené mastné kyseliny, a to necelých 21 %. Procentuální složení mastných kyselin obsažených v dýni je uvedeno grafu 8.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina palmitová, kyselina stearová
- MUFA: kyselina olejová
- PUFA: kyselina linolová

5.4.3 Vlašské ořechy

Vlašské ořechy obsahovaly převážně mononenasycené mastné kyseliny, které tvořily přes 65 % celkových mastných kyselin. Dále bylo sledováno u vlašských ořechů přes 20 % mononenasycených mastných kyselin a nejmenší podíl byl pozorován u nasycených mastných kyselin. Procentuální složení mastných kyselin obsažených ve vlašských ořeších je uvedeno v grafu 7.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina palmitová, kyselina stearová
- MUFA: kyselina palmitolejová, kyselina olejová
- PUFA: kyselina linolaidová, kyselina linolová

5.4.4 Kokos

U kokosu bylo pozorováno většinové množství nasycených mastných kyselin, které tvořily přes 94 % celkových mastných kyselin. Zbýlých necelých 6 % tvořily mononenasycené mastné kyseliny, přičemž polynenasycené mastné kyseliny nebyly u kokosu detekovány. Procentuální složení mastných kyselin obsažených v kokosu je uvedeno v grafu 8.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina kaprylová, kyselina lauronová, kyselina myristová, kyselina palmitová, kyselina stearová
- MUFA: kyselina palmitolejová, kyselina olejová

5.4.5 Mandle

U mandlí bylo pozorováno většinové množství mononenasycených mastných kyselin, které tvořily přes 84 % celkových mastných kyselin. Polynenasycené mastné kyseliny byly pozorovány v minimálním množství menším než 2 % a také byly u mandlí pozorovány nasycené mastné kyseliny v celkovém obsahu 14 %. Procentuální složení mastných kyselin obsažených v mandlích je uvedeno v grafu 7.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina palmitová, kyselina stearová
- MUFA: kyselina palmitolejová, kyselina olejová
- PUFA: kyselina linolaidová

5.4.6 Sezam

Sezamová semínka obsahovala převážně mononenasycené mastné kyseliny, které tvořily přes 65 % celkových mastných kyselin. Dále byly stejně jako u mandlí v minimálním množství menším než 2 % pozorovány polynenasycené mastné kyseliny a také byly detekovány nasycené mastné kyseliny v celkovém obsahu 32 %. Procentuální složení mastných kyselin obsažených v sezamu je uvedeno v grafu 7.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina palmitová, kyselina stearová
- MUFA: kyselina olejová
- PUFA: kyselina linolaidová

5.4.7 Fíková semínka

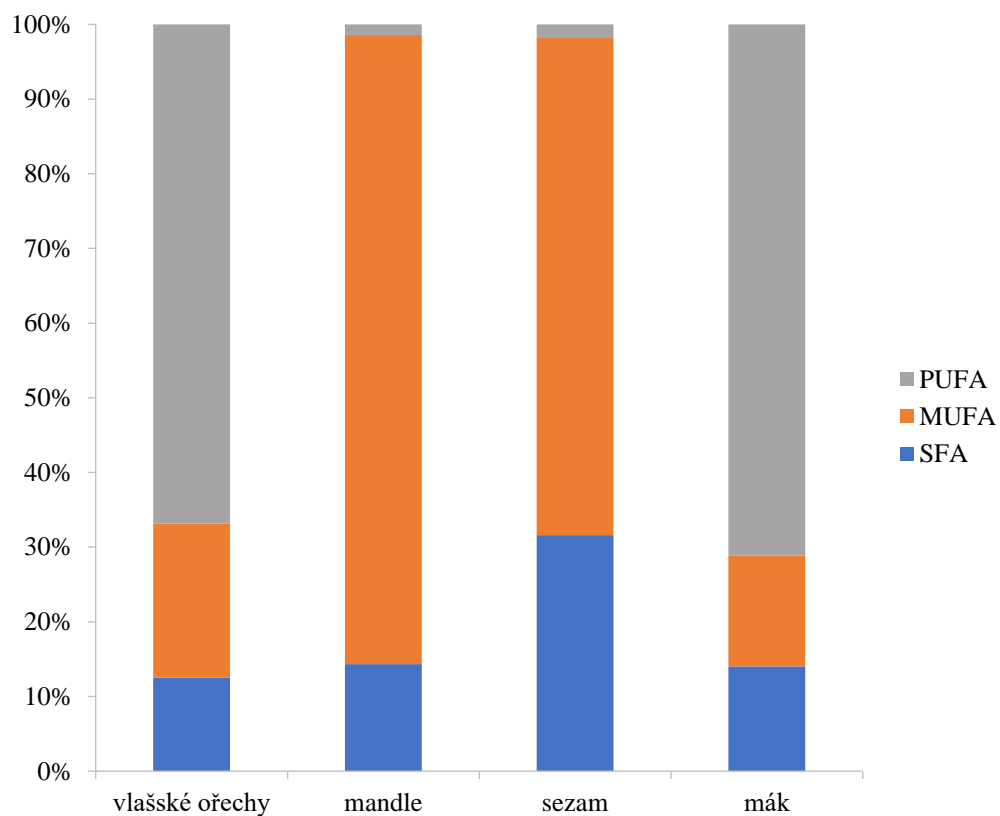
U fíkových semínek bylo pozorováno většinové množství nasycených mastných kyselin, které tvořily přes 97 % celkových mastných kyselin. Mononenasycených mastných kyselin bylo zjištěno minimální množství, a to méně než 3 %, přičemž polynenasycené mastné kyseliny nebyly v případě fíkových semínek detekovány. Procentuální složení mastných kyselin obsažených ve fíkách je uvedeno v grafu 8.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina palmitová, kyselina stearová
- MUFA: kyselina palmitolejová

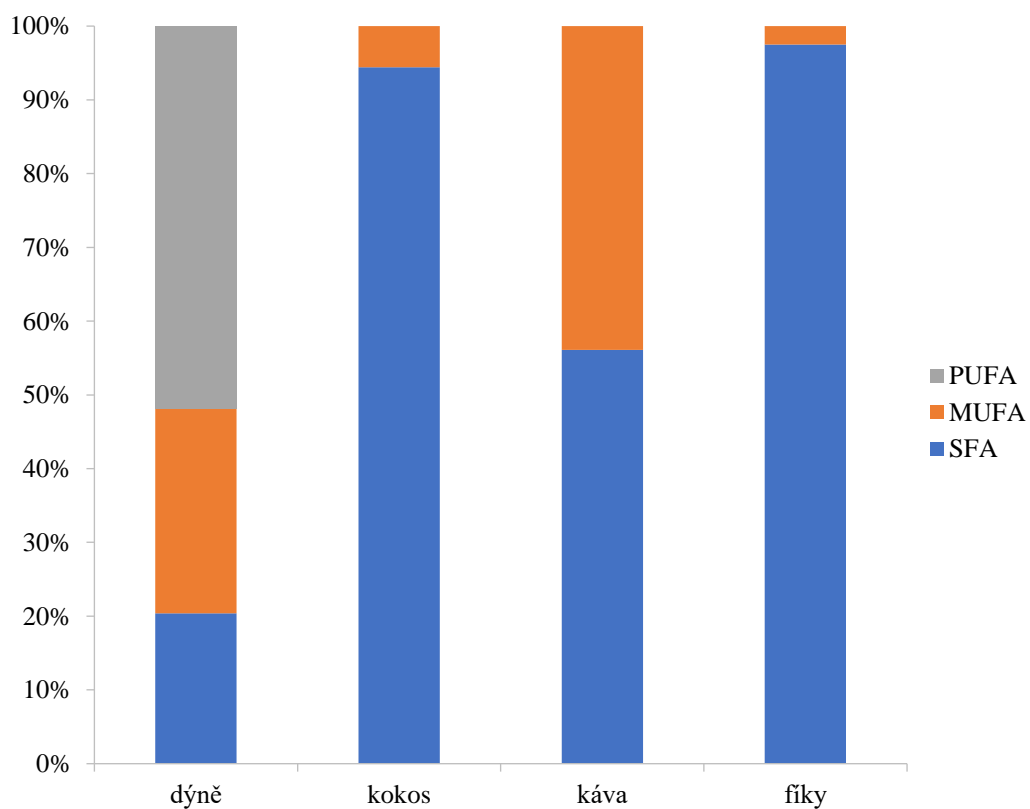
5.4.8 Káva

Pražená kávová zrna obsahovala převážně nasycené mastné kyseliny, které tvořily přes 56 % celkových mastných kyselin. Dále bylo pozorováno přes 43 % mononenasycených mastných kyselin, přičemž polynenasycené mastné kyseliny nebyly v případě kávových zrn detekovány. Procentuální složení mastných kyselin obsažených v kávě je uvedeno v grafu 8.

- SFA: kyselina kapronová, kyselina lauronová, kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina arachidonová, kyselina lignocerová
- MUFA: kyselina palmitolejová, kyselina olejová



Graf 7: Srovnání složení mastných kyselin podle saturace



Graf 8: Srovnání složení mastných kyselin podle saturace

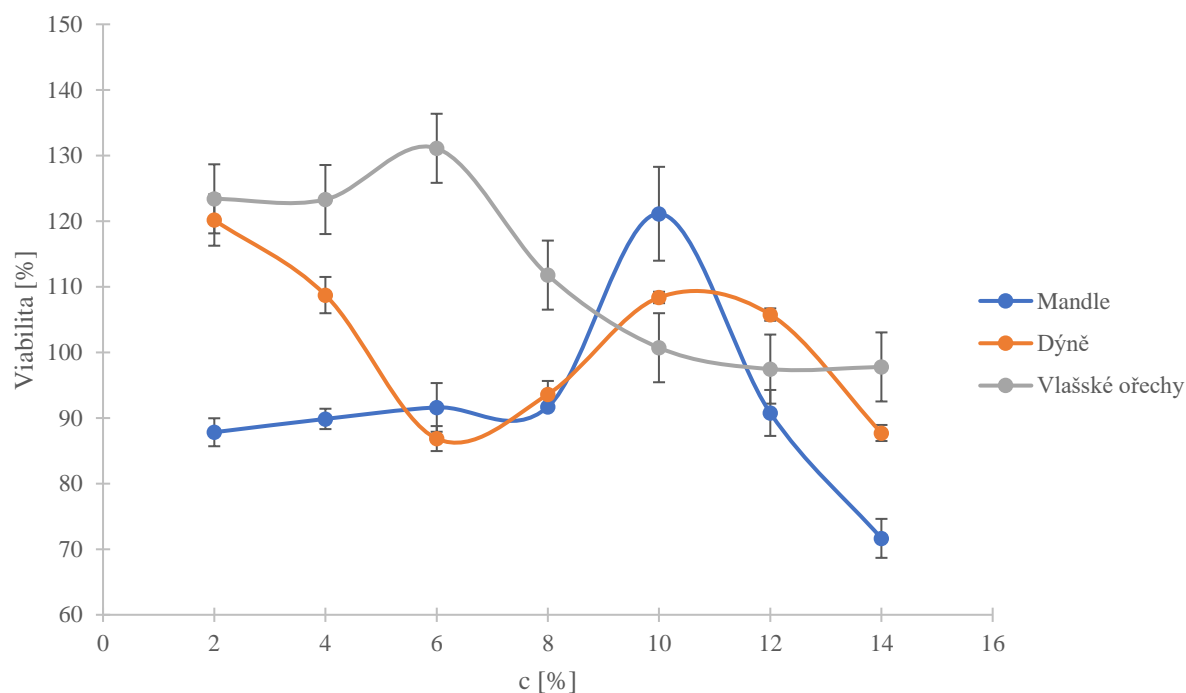
5.5 MTT test cytotoxicity

MTT test cytotoxicity byl proveden podle postupu v bodě 4.6. Mitochondriální enzymy vitálních buněk jsou schopny redukovat žluté MTT na fialový derivát formazanu, který dále zůstává uvnitř buňky ve formě nerozpustných krystalů. Tyto krystalky se působením detergentu rozpustily za vzniku čírého fialového roztoku, který se stanovoval spektrofotometricky. Ve všech jamkách prvního sloupce mikrotitrační destičky bylo napipetováno médium jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 5. Všechny výpočty byly provedeny v programu MS Excel.

Tabulka 5: Výsledky MTT testu pro testované vodné extrakty

Testovaná látka	Koncentrace roztoku [obj. %]	Viabilita [%]
Mandle	2	87,82±2,13
	4	89,85±1,55
	6	91,61±3,71
	8	91,69±0,27
	10	121,12±7,15
	12	90,77±3,5
	14	71,65±2,97
Dýňová semínka	2	120,17±2,64
	4	108,73±4,27
	6	86,86±2,63
	8	93,59±5,39
	10	108,37±7,67
	12	105,76±1,51
	14	87,71±1,52
Vlašské ořechy	2	123,39±3,91
	4	123,29±2,76
	6	131,10±1,91
	8	111,77±2,04
	10	100,71±0,87
	12	97,45±0,94
	14	97,78±1,22

Hraniční hodnotou, kdy ještě testovaný vzorek nevykazuje cytotoxické účinky, je 60 %. Všechny testované vodné extrakty tuto podmínku splňují, přičemž většina vodných extraktů z vlašských ořechů a dýňových semínek přesahovala hodnotu 100%, a tedy můžeme předpokládat pozitivní účinky při použití na buněčných kulturách.



Graf 9: Závislost viability buněk na koncentraci testovaného extraktu

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci extraktů z vybraných rostlin se zvýšeným obsahem lipidické složky. Byly připraveny extrakty vodné, ethanolové a hexanové. Tyto extrakty byly připraveny z makových semínek, strouhaného kokosu, dýňových semínek, mandlových jader, vlašských ořechů, zrnkové kávy, sezamových semínek a fíkových semínek. U extraktů byl sledován obsah celkových polyfenolů a flavonoidů a antioxidační aktivita. U vybraných extraktů s vysokým obsahem aktivních látek i antioxidační aktivitou byl proveden i test cytotoxicity, aby byla potvrzena jejich bezpečnost pro další potenciální aplikace.

Nejvyšší obsah polyfenolů ve vodných extraktech vybraných rostlinných materiálů byl stanoven u zrnkové kávy, mandlových jader a dýňových semínek, z ethanolových extraktů byl nejvyšší obsah polyfenolů stanoven u zrnkové kávy (80% ethanol), vlašských ořechů (80% ethanol) a mandlí (20% ethanol). Obecně bylo větší množství polyfenolů stanoveno spíše u vodných extraktů než u ethanolových.

Nejvyšší obsah flavonoidů ve vodných extraktech vybraných rostlinných materiálů byl zaznamenán u kávových zrn a vlašských ořechů, z ethanolových extraktů byl stejně jako u vodných extraktů nejvyšší obsah flavonoidů zaznamenán u kávových zrn (20% ethanol) a vlašských ořechů (80% ethanol). Obecně bylo zaznamenáno větší množství flavonoidů spíše u vodných extraktů než u ethanolových.

Většina vybraných vzorků vykazovala vyšší antioxidační aktivitu jako ethanolový extrakt, přičemž výjimku tvořily vodné extrakty makových semínek a fíkových semínek. Z jednotlivých vzorků byla pozorována nejvyšší antioxidační aktivita u ethanolových extraktů vlašských ořechů (60% ethanol) a makových semínek (20% ethanol). Samotné roztoky ethanolu ve vodě nevykazovaly antioxidační aktivitu.

U lipidických extraktů bylo po plynové chromatografii zjištěno, že nejvyšší podíl mononenasycených mastných kyselin obsahovaly extrakty sezamových semínek a mandlových jader a nejvyšší podíl polynenasycených mastných kyselin obsahovaly extrakty makových semínek, vlašských ořechů a dýňových semínek. Z mononenasycených mastných kyselin to byly především kyselina palmitolejová a kyselina olejová. Z polynenasycených mastných kyselin se objevovaly především kyselina linolová a kyselina linolaidová. Dále byl sledován nejvyšší podíl nasycených mastných kyselin u extraktů kávových zrn, kokosu a sezamových semínek. Z těchto kyselin to byly především kyselina kapronová, kyselina palmitová a kyselina stearová.

Nakonec byla u vybraných vzorků s vysokým obsahem aktivních látek testována cytotoxicita. Všechny testované extrakty ve všech koncentracích (0 – 16 %) dosahovaly velmi vysokých hodnot viability a u vlašských ořechů a dýňových semínek pak tyto hodnoty ve většině koncentrací překračovaly 100 %, extrakty pravděpodobně sloužily jako jistý aktivátor růstu buněk. U mandlí dosahoval nejvyšší viabilitu vzorek o koncentraci 10 % ($121,12 \pm 7,15$ %) a u dýňových semínek to byl vzorek o koncentraci 2 % ($120,17 \pm 2,64$ %). Nejvyšší viabilitu u vlašských ořechů dosahoval vzorek o koncentraci 6 % ($131,10 \pm 1,91$ %). Můžeme se tedy domnívat, že testované látky mají pozitivní vliv na buněčné kultury a jsou potenciálně využitelné v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH

- [1] BLOMHOFF, R. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *The British journal of nutrition*. 2006, 96(2), 52-60.
- [2] *Léčivá moc vitaminů, bylin a minerálních látek*. Praha: Reader's Digest Výběr, 2001. ISBN 80-861-9624-0.
- [3] CHAN, Edward a C.R. ELEVITCH. *Cocos nucifera* (coconut). Traditional trees of Pacific Islands: their culture, environment, and use [online]. Ver. 2.1. Hōlualoa, Hawai'i: Permanent Agriculture Resources, c2006 [cit. 2019-03-30]. ISBN 0970254458. Dostupné z: <https://agroforestry.org/images/pdfs/Cocos-coconut.pdf>
- [4] Kokosový ořech (kokos) - popis. *Exotické ovoce* [online]. 2007 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://exoticke-ovoce.coajak.cz/home/kokosovy-orech/kokosovy-orech-kokos-popis.htm>
- [5] BEARE-ROGERS, J. L., A. DIEFFENBACHER a J. V. HOLM. Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2001, 73(4), 685-744. DOI: 10.1351/pac200173040685. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2001.73.issue-4/pac200173040685/pac200173040685.xml>
- [6] Coconut pngs. In: www.freepngs.com [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: https://static.wixstatic.com/media/2cd43b_1c9553b9e1e34b9e99819d36715d3a82~mv2_d_2548_2287_s_2.png?dn=
- [7] MOUDRÝ, Jan a kol. *Alternativní plodiny*. 1. Praha: Profi Press, 2011, s. 85. ISBN 978-80-8672-640-3.
- [8] YADAV, Mukesh, Shalini JAIN, Radha TOMAR, G. B. K. S. PRASAD a Hariom YADAV. Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review. *Nutrition Research Reviews*. 2010, 23(02), 184-190. DOI: 10.1017/S0954422410000107. ISSN 0954-4224. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954422410000107
- [9] In: Etna [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: https://cdn.shopify.com/s/files/1/1746/8569/products/Pumpkin_Seeds_-_Out_530x@2x.png?v=1488639428
- [10] HEJNÝ, Slavomil a Bohumil SLAVÍK, ed. *Květena České republiky*. 2., nezm. vyd. Praha: Academia, 2003. ISBN 80-200-1089-0.
- [11] SAVAGE, G.P. Plant Foods for Human Nutrition. 56(1), 75-82. DOI: 10.1023/A:1008175606698. ISSN 09219668. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1008175606698>
- [12] TREBEN, Maria. *Zdraví z boží lékárny: léčivé byliny, rady a zkušenosti*. České Budějovice: Dona, 1991. ISBN 80-900-0806-2.
- [13] SABATE, Joan, Gary E. FRASER, Kenneth BURKE, Synnove F. KNUTSEN, Hannelore BENNETT a Kristian D. LINDSTED. Effects of Walnuts on Serum Lipid Levels and Blood Pressure in Normal Men. *New England Journal of Medicine*. 1993, 328(9), 603-607. DOI: 10.1056/NEJM199303043280902. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199303043280902>
- [14] Walnut. In: PNG Images [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <http://pngimg.com/download/22870>
- [15] MUSA ÖZCAN, M. a Çigdem ATALAY. Determination of seed and oil properties of some poppy (<i>Papaver somniferum L.</i>) varieties. *Grasas y Aceites*. 2006, 57(2), 169-174. DOI:

- 10.3989/gya.2006.v57.i2.33. ISSN 1988-4214. Dostupné také z: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/33/32>
- [16] HALVORSEN, B.L., M.H. CARLSEN, K.M. PHILLIPS, S.K. BOHN, K. HOLTE, D.R. JACOBS JR a R. BLOMHOFF. Content of redoxative compounds (i.e., antioxidants) in foods consumed in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006, 84(1), 95-135.
- [17] VECKA, M., A. ŽÁK a E. TVRZICKÁ. Rostlinné steroly jako funkční potraviny. *Časopis lékařů českých*. 2007, 146(4), 337-342.
- [18] Poppy seed. In: The Herb Shop [online]. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: https://cdn.shopify.com/s/files/1/0219/5528/products/poppy-seed_1024x1024.png?v=1368729546
- [19] STEINBACH, Gunter. *Lexikon užitečných rostlin: zeleninová, bylinná a ovocná zahrada s více než 250 barevnými portréty*. Praha: Knižní klub, 1997. ISBN 80-717-6432-9.
- [20] SANCHEZ-PEREZ, R., K. JORGENSEN, C. E. OLSEN, F. DICENTA a B. L. MOLLER. Bitterness in Almonds. *PLANT PHYSIOLOGY*. 2008, 146(3), 1040-1052. DOI: 10.1104/pp.107.112979. ISSN 0032-0889. Dostupné také z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.112979>
- [21] CHEN, Chung-Yen, Karen LAPSLEY a Jeffrey BLUMBERG. A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, 86(14), 2245-2250. DOI: 10.1002/jsfa.2659. ISSN 0022-5142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2659>
- [22] Almond Stack Transparent. In: Stick PNG [online]. [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.stickpng.com/img/food/nuts/almond/almond-stack>
- [23] SAYDUT, A, M DUZ, C KAYA, A KAFADAR a C HAMAMCI. Transesterified sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil as a biodiesel fuel. *Bioresource Technology*. 2008, 99(14), 6656-6660. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.063. ISSN 0960-8524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407010012>
- [24] ELLEUCH, Mohamed, Dorothea BEDIGIAN a Adel ZITOUN. Sesame (*Sesamum indicum* L.) Seeds in Food, Nutrition, and Health. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2011, 2011, , 1029-1036. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10122-7. ISBN 9780123756886. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123756886101227>
- [25] KHOSRAVI-BOROUJENI, Hossein, Elham NIKBAKHT, Ernesta NATANELOV a Saman KHALES. Can sesame consumption improve blood pressure? A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017, 97(10), 3087-3094. DOI: 10.1002/jsfa.8361. ISSN 0022-5142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.8361>
- [26] VITTORI GOUVEIA, Luciana de Almeida, Carolina Alves CARDOSO, Glaucia Maria Moraes DE OLIVEIRA, Glorimar ROSA a Annie Seixas Bello MOREIRA. Effects of the Intake of Sesame Seeds (*Sesamum indicum* L.) and Derivatives on Oxidative Stress: A Systematic Review. *Journal of Medicinal Food*. 2016, 19(4), 337-345. DOI: 10.1089/jmf.2015.0075. ISSN 1096-620X. Dostupné také z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2015.0075>
- [27] Sesame Seeds. In: Stick PNG [online]. [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.stickpng.com/img/food/seeds/sesame-seeds>
- [28] VALÍČEK, Pavel. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0939-6.

- [29]SKALICKÁ, Anna, Václav VĚTVIČKA a Václav ZELENÝ. *Botanický slovník rodových jmen cévnatých rostlin: [latinsko-český, česko-latinský]*. Praha: Aventinum, 2012. ISBN 978-80-7442-031-3.
- [30]HARZALLAH, Arij, Amira Mnari BHOURI, Zahra AMRI, Hala SOLTANA a Mohamed HAMMAMI. Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 2016, 83, 255-267. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.043. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015306282>
- [31]Fig PNG Image Background. In: PNG Arts[online]. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: <https://www.pngarts.com/explore/31579>
- [32]FARAH, Adriana a Carmen Marino DONANGELO. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2006, 18(1), 23-36. DOI: 10.1590/S1677-04202006000100003. ISSN 1677-0420.
- [33]MUSSATTO, Solange I., Ercília M. S. MACHADO, Silvia MARTINS a José A. TEIXEIRA. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, 4(5), 661-672. DOI: 10.1007/s11947-011-0565-z. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-011-0565-z>
- [34]POOLE, Robin, Oliver J KENNEDY, Paul RODERICK, Jonathan A FALLOWFIELD, Peter C HAYES a Julie PARKES. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ*. DOI: 10.1136/bmj.j5024. ISSN 0959-8138. Dostupné také z: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.j5024>
- [35]KILLER, Sophie C., Andrew K. BLANNIN, Asker E. JEUKENDRUP a Dylan THOMPSON. No Evidence of Dehydration with Moderate Daily Coffee Intake: A Counterbalanced Cross-Over Study in a Free-Living Population. *PLoS ONE*. 2014, 9(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0084154. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0084154>
- [36]Pile of Roasted Coffee Beans Transparent PNG. In: Stick PNG [online]. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: <http://www.stickpng.com/img/food/coffee/pile-of-roasted-coffee-beans>
- [37]Kultivační podmínky. Biologie v kostce [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/243-kultivacni-podminky.html>
- [38]MCMURRY, John. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic.
- [39]LUGASI, Andrea, HóVÁRI, Judit. Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food* [online]. 2003, vol. 47 [cit. 2018-04-30], s. 79-86. Dostupný z www.isiknowledge.com
- [40]PANDEY KB, RIZVI SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009;2(5):270-278.
- [41]SLANINA, Jiří, TÁBORSKÁ, Eva. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem.Listy* [online]. 2004, roč. 98, č.4 [cit. 2018-04-30], s. 239-245. Dostupný z www.chemicke-listy.cz
- [42]VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. upr. vyd. Praha: Akademie, 2002. -186, 134, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [43] AULA, Sangeetha, Samyuktha LAKKIREDDY, Kaiser JAMIL, Atya KAPLEY, A. V. N. SWAMY a Harivardhan Reddy LAKKIREDDY. Biophysical, biopharmaceutical and toxicological

- significance of biomedical nanoparticles. RSC Advances. 2015, 5(59), 47830-47859. DOI: 10.1039/C5RA05889A. ISSN 2046-2069. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA05889A>
- [44] KUMAR S, PANDEY AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal. 2013;2013:162750. doi:10.1155/2013/162750.
- [45] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9704-4.
- [46] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy. 2004, č. 98, s. 174179.
- [47] MILLER, N. J., C. RICE-EVANS, M. J. DAVIES, V. GOPINATHAN a A. MILNER. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical science. London, 1993, 84(4), 407-41
- [48] RICE-EVANS, C. a N. J. MILLER. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods in Enzymology. 1994, 234, 279-293.
- [49] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [50] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [51] RÉDEL, George P. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics. 3. Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6753-2.
- [52] CIAPETTI, G., E. CENNI, L. PRATELLI, A. PIZZOFERRATO, Bodo JANSON, Karla DRESCHER, Gerhard GROSS a Hans SCHOEMAKER. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. Biomaterials. 1993, 14(5), 359-364. DOI: 10.1016/0142-9612(93)90055-7. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961293900557>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)

DNA – deoxyribonucleic acid

FFA – free fatty acid

GC – gas chromatography

LDL – low density lipoprotein

MTT – 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid

MUFA – monounsaturated fatty acid

PUFA – polyunsaturated fatty acid

SAFA – saturated fatty acid

TAA – celková antioxidační aktivita

TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay

Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

VLDL – very low density lipoprotein